

# Annals of Cancer Research and Therapy

掲載原著／要旨録

Ann Cancer Res Ther (Pub quart)  
Official Journal of the Japanese Society of  
Strategies for Cancer Research and Therapy

## ***Prognostic significance of the proliferative activity of human hepatocellular carcinoma shown by bromodeoxyuridine uptake***

*Vol. 6, No. 1, p 9~13*

Masashi Tsugita et al.

原発性肝細胞癌 (以下 HCC) における増殖能測定の意義を明らかにするために 24 例の HCC 患者において BrdU labeling index (以下 BrdU L.I.) を測定し、検討した。BrdU L.I. は 0~17.8% までの分布を示して、平均は  $3.01 \pm 4.22\%$  であった。その値は腫瘍径、肝内転移の有無、脈管侵襲の有無などの従来からの病理学的因子とは、関連が認められなかった。しかし、無再発生存期間を従属変数として多変量解析を行うと、BrdU は有

意な共変量であることが示された。

この結果に基づいて BrdU L.I. が 2% 以下の群と以上の群に分けると、無再発生存期間と生存期いずれも有意に 2% 以下の群で良好であった ( $p=0.0275, 0.0462$ )。また、2% 以上の群の症例はすべて 2.5 年以内に再発をきたしたが、2% 以下の群での再発率は 40% であった。

以上より、BrdU L.I. は HCC 術後患者の経過観察の指針になると考えられた。

(次田 正, 東京女子医科大学消化器病センター)

## ***Eradication of peritoneal dissemination in mice by combination therapy using liposome-encapsulated leucovorin with 5-fluorouracil***

*Vol. 6, No. 1, p 15~19*

Kei Shinozaki et al.

LV/5-FU 併用化学療法を癌腹膜播種治療に応用する目的で、腹腔内薬剤徐放性マイクロカプセルとしてリポゾーム封入型ロイコボリン剤を考案・作製し、5-FU との腹腔内併用投与による腹膜播種性転移に対する治療効果について実験的に検討した。

【方法】 実験には 5 週齢、雄性、BALB/c マウスを用い、リポゾーム封入体ロイコボリン剤 (以下、LV liposome) は、ロイコボリン-Ca 液 (3 mg/ml) にリン脂質混合体 Presome PPG-I® を 40 mg/ml の割合で混合、超音波処理にて作製した。LV liposome の腹腔内 LV 徐放性は、LV liposome 剤および free LV (実質 LV 投与量 60 mg/kg) をマウス腹腔内に注入後、経時的 (1, 2, 4, 6 時間後) に腹腔内洗浄液中 LV 濃度を測定して検討した。

① LV および 5-FU の至適作用濃度と作用時間の検討 (*in vitro*): 腫瘍細胞として Colon 26 を

用い、LV 濃度は、 $2 \mu\text{M}$  および  $20 \mu\text{M}$  とし、5-FU 濃度は  $1-100 \mu\text{M}$  の範囲で設定した。腫瘍細胞に 5-FU を 6 時間持続的暴露。同時に LV を 2 時間 (短時間暴露) および 6 時間 (持続的暴露) 併用暴露した後、腫瘍増殖阻止率 (T/C ratio (%)) を MTT assay 法にて測定した。

② 腹膜転移モデルを用いた治療実験 (*in vivo*): 治療群を control (生食水) 群, liposome 群, 5-FU 群, LV/5-FU 併用群, LV liposome/5-FU 併用群の 5 群に分けた。5-FU 投与量と LV 実質投与量はともに 60 mg/kg とした。腹腔内薬剤投与は、各群のマウスに対し腫瘍細胞接種後 24 時間に行い、20 日目に犠牲死せしめ、体重、腫瘍重量を測定した。

【結果と考察】 本実験系では、高い LV 保持効率 (32.8%) のリポゾーム剤を作製できた。またリポゾーム封入型ロイコボリン剤をマウス腹腔内投与すると、LV 単独投与時に比べ、2 時間後から 6 時間後まで 2 倍以上の腹腔内 LV 濃度が得られ

( $p < 0.01$ ), 十分な LV 徐放効果を確認できた。

① *in vitro* の実験では, Colon 26 培養細胞に対して LV を 5-FU とともに持続的(6 時間)に併用暴露した場合, LV は  $2 \mu\text{M}$  の低濃度でも 5-FU の modulator として有効に作用した ( $p < 0.05$ )。他方, LV の併用暴露時間が短時間(2 時間)の場合には高濃度の LV ( $20 \mu\text{M}$ ) が必要であった。すなわち, 薬剤持続投与が困難な腹膜播種治療系では, LV の剤形を変え, 徐放剤として用いると有用であることが確認できた。

② マウス腹膜転移モデル治療実験では, LV

liposome/5-FU 併用群の腹膜転移腫瘍総重量は, LV/5-FU 併用群および 5-FU 群の腹膜転移腫瘍総重量に比べ有意な減少を示した ( $p = 0.0001$ ,  $p = 0.01$ )。また LV liposome/5-FU 併用群では腫瘍形成のない動物が 37.5% に認められたが, 他の群ではそれぞれ 100% の腫瘍形成を認めた。本研究より術中補助化学療法として, 腹膜播種の治療および予防におけるリポゾーム封入ロイコボリン/5-FU 腹腔内併用療法の有用性が示唆される。

(篠崎 啓, 群馬大学医学部第一外科学教室)

### ***Increased expression of HLA and adhesion molecules, and increase of CD3 (+), CD8 (+) tumor-infiltrating lymphocytes after administration of interferon gamma in patients with gastrointestinal cancer***

Vol. 6, No. 1, p 21~26

Masahiko Shibata et al.

細胞性免疫応答は, T リンパ球が抗原となる分子を認識することによりはじまる。腫瘍細胞の HLA class 1, HLA-DR 分子や ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), LFA-3 (lymphocyte function associated antigen-3) といった接着分子の発現は担癌宿主の免疫動態にもきわめて重要と考えられる。Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) は腫瘍細胞および宿主細胞に対し様々な作用を有するとされ, HLA 分子, 接着分子の発現の増強はその重要な働きの一つである。しかしながら, これらは主に *in vitro* の研究によるものであり, とりわけヒト癌における *in vivo* での効果は不明である。筆者らは消化器癌に対する IFN- $\gamma$  の局所投与のこれらの効果について検討した。

【対象と方法】 対象は胃癌 45 例, 大腸癌 85 例, 肝細胞癌 17 例であり, 100 万単位の IFN- $\gamma$  をこのうち胃癌 5 例, 大腸癌 8 例, 肝細胞癌 4 例に対し, 内視鏡的, あるいは超音波下に局所投与した。7 日後, 手術にて摘出した標本の HE 染色および免疫組織学的検索を行い非投与群と比較検討した。

【結果と考察】 まず HE 染色でみられた TIL 高浸潤群の割合は各癌種において投与群で高い傾向がみられたが, その差は有意ではなかった。

ICAM-1 の発現は肝細胞癌において非投与例では全く認めないのに対し, 投与例では 75% に出現した。LFA-3 の高発現例は大腸癌, 肝細胞癌において IFN- $\gamma$  投与群で増加した (それぞれ  $p < 0.05$ )。CD 3 (+), CD 8 (+) 腫瘍浸潤細胞の高浸潤群の割合は胃癌, 大腸癌, 肝細胞癌のいずれにおいても増加した (それぞれ  $p < 0.05$ )。HLA class 1, HLA-DR の発現は投与群で増強傾向はみられたが, その差は有意ではなかった。

以上の結果は IFN- $\gamma$  の局所投与により接着分子の発現は増強された結果であり, 局所における免疫応答が高められたものと推測される。CD 3 (+), CD 8 (+) 細胞の浸潤増強は循環血液中の宿主細胞が癌局所に集積, 増殖した結果と考えられる。このように IFN- $\gamma$  の術前投与は有効と考えられる。

(柴田昌彦, 日本大学医学部第一外科教室)

***Molecular targeting chemotherapy for glioblastoma****Vol. 6, No. 1, p27~31*

Tatsunori Okamura et al.

薬剤耐性因子を標的とした腫瘍特異的な抗癌剤治療（分子標的治療）について膠芽腫での可能性を明らかにした。

ヒト膠芽腫細胞 T 98 G, U-251 MG を含むヒト癌細胞 12 株を用い、抗癌剤シスプラチン (CDDP), マイトマイシン C (MMC), 塩酸ニムスチン (ACNU) について分子標的としての耐性因子（効果規定因子）を求めた。耐性因子候補として、NADPH : cytochrome P 450 reductase (P 450), NADPH : quinone oxidoreductase (DTD), glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST), p-glycoprotein (mw. 170,000), multidrug resistance associated protein (MRP) を選び、その活性・総量、遺伝子発現を解析した。抗腫瘍効果はトリパン青色素排出法にて評価し、生化学的修飾による効果増強についても検討した。

結果として、膠芽腫以外のヒト癌細胞 10 株において CDDP では GST $\pi$  が、ACNU では P 450 が

それぞれ耐性規定因子であり、MMC の抗腫瘍効果は DTD による活性化と GST $\pi$  による不活性化の競合により規定されることが示された。膠芽腫細胞においては、これら三つの各酵素活性と GSH 総量がきわめて高く、MMC には中等度の感受性があったが CDDP と ACNU にはきわめて耐性であった。また、これらの分子標的は修飾可能で、GST $\pi$  関与耐性は ethacrynic acid との併用により克服され、P 450 関与耐性は metyrapone により抗腫瘍効果の増強が得られた。GSH により活性化される MMC 誘導体の新規抗癌剤 KW 2149 の使用は GSH のきわめて高い T 98 G, U-251 MG に対し有効であった。

以上より、膠芽腫に対する汎用抗癌剤の効果規定因子、およびその修飾が抗腫瘍効果の増強をもたらすことが明らかとなった。遺伝子導入も含め、腫瘍個々の分子診断に基づく特異的治療の可能性を示唆する結果と考えられた。

(岡村達憲, 広島大学医学部脳神経外科学教室)

***Transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway and its disruption in human cancer****Vol. 6, No. 1, p33~37*

Seiichi Takenoshita et al.

【目的】 TGF- $\beta$  レセプターはリガンドである TGF- $\beta$  と結合し、細胞増殖抑制作用を中心に、多彩なシグナルを細胞内に伝える。TGF- $\beta$  は最初、細胞の増殖を促進し、かつ形質転換すなわち癌化を促進する増殖促進作用が注目されたが、これは線維芽細胞や血管平滑筋細胞など一部の細胞に対して認められるのみで、実際には上皮細胞、血管内皮細胞、血球系細胞など多くの細胞に対して増殖抑制作用を有することが明らかにされた。そして、TGF- $\beta$  が正常細胞のみならず、ある種の癌細胞に対してその増殖を抑える働きをもつことや、TGF- $\beta$  の増殖抑制作用に抵抗性を示す癌細

胞が存在することから、この遺伝子は癌抑制遺伝子の候補と考えられている。最近では膀胱癌、大腸癌をはじめとしたいくつかの癌組織において、レセプター自身の異常以外に、Smad など細胞内シグナル伝達物質にも異常が起こることがわかってきた。これまでにわれわれはゲノムにおける遺伝子構造を短期間に確実に決定する新しい核酸塩基配列決定法を開発し、この方法を利用して TGF- $\beta$  II 型レセプター (R II) およびいくつかの Smad 関連遺伝子の構造を決定してきた。今回は癌組織における R II および Smad 2 の遺伝子の変異の詳細な解析を行った。

【方法】 遺伝子の構造は “long distance se-

quencer method”を中心に決定し、そのイントロン配列を利用して R II および Smad 2 遺伝子のすべてのエクソンを増幅するプライマーを設計した。これらのプライマーを用いて胃癌、大腸癌、肺癌などの組織から抽出したゲノム DNA を PCR-SSCP 法で解析した。変異の認められた DNA フラグメントは塩基配列を決定し、同一患者の正常組織と比較検討した。また、replication error (RER) は 8 カ所の mi crosatellite instability (MI) マーカーを対象にして MI の有無を検討し、2 カ所以上を RER 陽性とした。

【結果】 R II は 7 個のエクソンで構成され hot spot はエクソン 3 と 7 であった。Smad 2 は 11 個のエクソンで構成され hot spot はエクソン 4 と 11 であった。それぞれ 8 種類と 11 種類のプライマーを作成し、R II, Smad 2 ともすべてのエ

クソンを解析することができた。R II では、胃癌で 2 例、大腸癌で 2 例、肺癌で 1 例の変異を認め、すべて RER 陽性であった。Smad 2 では、大腸癌の 2 例以外は変異を認めなかった。

【考察】 これまでの解析の結果では、① RII の異常はゲノムの不安定性をもつ大腸癌あるいは胃癌以外はまれである。② 膀胱癌の癌抑制遺伝子 Smad 4/DPC 4 と同じ染色体 18q21 に位置する Smad 2 の癌組織における変異は、予想されたほど多くない。したがって、TGF- $\beta$  のシグナル伝達機構と癌と関連の解明には、シグナル伝達に関するすべての遺伝子の詳細な解析が必要ではあるが、いずれにしても、増殖抑制因子のシグナル伝達経路に関与する因子は“癌抑制遺伝子”として機能していると考えられる。

(竹之下誠一, 群馬大学医学部第一外科学教室)

## *Specificity of brain tumor capillaries and novel drug delivery system*

*Vol. 6, No. 1, p39~44*

Kiyonobu Ikezaki et al.

【目的・方法】 悪性神経膠腫の増殖にはさまざまな成長因子が関与し、また他臓器腫瘍と異なり血液脳関門の存在によって悪性神経膠腫の治療は著しく制限される。われわれは vascular endothelial growth factor (VEGF) に注目し、腫瘍血管増生能と腫瘍細胞における VEGF 発現との関係を、手術標本を用いて他の血管成長因子の発現と比較しつつ検討した。各種脳腫瘍サンプルを凍結保存し、TGF- $\alpha$ ,  $\beta$ , basic FGF, VEGF の蛋白レベルでの発現を免疫組織化学で評価した。また、mRNA レベルでの発現を Northern blot 法で半定量し、血管新生能との関連を統計的に比較検討した。

一方、脳腫瘍血管の特異性を、形態的变化のみならず、P 糖蛋白や  $\gamma$ -GTP などの血液脳関門特異蛋白の発現の有無で検討した。さらに、各種血管作動性薬剤を内頸動脈経由で投与することにより、腫瘍血管の血流量や透過性を変化させ、抗腫

瘍剤の効果的かつ選択的投与法を検討した。Ca チャンネル阻害剤、ヒスタミン、IL-2、アデノシン、ATP、LTC 4、ブラジキニンなどを内頸動脈より投与し、水素クリアランス法にて脳血流量の変化を、各種トレーサーを用いたオートラジオグラフィで血管透過性を検討した。

### 【結果】

① 4 種の血管成長因子は、多くの腫瘍でさまざまな程度で発現していたが、血管密度と統計的に有意に関連していたのは VEGF のみであった。神経膠腫では腫瘍悪性度と VEGF の発現に正の相関が認められた。

② 神経外胚葉系腫瘍の血管では、血液脳関門特異蛋白は比較的保たれており、抗腫瘍剤の効果的な到達には血液腫瘍関門の修飾が必須と考えられた。

③ 使用したすべての血管作動性薬剤は、程度の差はあるが、全身血圧などを変化させることなく、腫瘍血管の血流量、透過性を選択的に増加さ

せた。

【考 察】 悪性神経膠腫の治療は他の臓器の腫瘍と異なり、血液脳関門の存在によって著しく制限されている。これを克服するために、われわれは、① 腫瘍血管 (VEGF 受容体) そのものを標的として、腫瘍の増殖を制御する、② 血液脳(腫瘍)関門を選択的に修飾して、抗腫瘍遺伝子を含む抗

腫瘍剤を効果的かつ選択的に腫瘍細胞に到達させる二つの方法を考え、臨床応用をめざしている。特にブラジキニンによる腫瘍血管選択的透過性亢進を用いた臨床治験は、すでに欧米で開始され、悪性神経膠腫における制癌剤併用での奏効率は約60%と高い値が得られている。

(池崎清信, 九州大学医学部脳神経外科学教室)

### *Combined immunotherapy with macrophage colony-stimulating factor and OK-432 prevents peritoneal metastasis in mice*

*Vol. 6, No. 1, p 45~49*

Yasumi Yajima et al.

【目 的】 マクロファージをエフェクター細胞とした腹腔転移抑制実験モデルを考案した。腹腔マクロファージの抗腫瘍活性を増強させる目的で、M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) と OK-432 を使用した。

【方 法】 6週齢の雄性 BALB/c マウスを4群に分け各群10匹を用いた。① M-CSF 群, ② OK-432 群, ③ M-CSF+OK-432 群, ④ 生食群のそれぞれに対し、M-CSF (1万U), OK-432 (0.2 KE) を5日間腹腔内投与した。腹膜播種を起こさせる腫瘍細胞株には Colon 26 細胞を用いた。

1: 薬剤腹腔内投与終了の翌日(6日目)に、腹腔内細胞を採取。総細胞数、および2重エラストナーゼ染色により腹腔マクロファージを染色し、その数を算定した。

2: 1にて採取した腹腔マクロファージと腫瘍細胞株 Colon 26 を E/T 比, 100:1, 50:1, 25:1 の割合でそれぞれ24時間培養し、% cytotoxicity を  $^3\text{H-TdR}$  法により測定した。

3: 1にて採取した腹腔マクロファージを cRPMI 1640 中で24時間培養し、上清中の TNF- $\alpha$  および NO $_2$  を測定した。

4: 薬剤腹腔内投与終了の翌日、各群のマウスに Colon 26 細胞を  $1 \times 10^3$  個腹腔内注入した。Colon 26 細胞接種後20日目にマウスを屠殺、体重、腹腔内の腫瘍重量を測定した。

5: 各群のマウスは腹腔内に Colon 26 細胞を

注入後、経時的に生存を観察し生存曲線を作成した。

【結 果】 1:M-CSF 群, OK-432 群腹腔内細胞数は有意に増加し、併用投与群での細胞数増加がもっとも大であった。同様の結果が腹腔マクロファージ数でも認められた。

2:E/T 比が 100:1 のとき、OK-432 単独投与でも M-CSF との併用投与でも、マクロファージの % cytotoxicity が有意に高められた。

3:M-CSF と OK-432 の併用投与群では TNF- $\alpha$  の有意な増加を認め、他群に比べ NO $_2$  の有意な増加も認めた。

4:M-CSF と OK-432 の併用投与群は他群に比し、体重減少が軽度で、Colon 26 細胞の腹腔内での増殖も有意に抑制した。

5:OK-432 単独投与群および M-CSF との併用投与群では、M-CSF 群および生食群に比べ生存日数が有意に延長した。また、併用投与群では、OK-432 単独投与群に比べ有意に生存日数の延長が認められた。

【考 察】 M-CSF と OK-432 の併用投与は、Colon 26 細胞の腹膜播種モデルに対する腫瘍増殖抑制効果を有意に増強させ、生存曲線も有意に延長した。この効果のメカニズムとして OK-432 によるマクロファージの細胞数増加、抗腫瘍活性増強および M-CSF によるマクロファージの purity 増加作用の関与が考えられた。また、M-CSF と OK-432 の併用投与によりマクロファ-

ジからの TNF- $\alpha$  および NO<sub>2</sub> の放出増加が認められ、抗腫瘍効果発現のエフェクター分子である

と推察された。

(矢島靖巳, 群馬大学医学部第一外科学教室)

## ***Role of the Rb-mediated cell cycle regulatory pathway in human ovarian cancer cell lines***

*Vol. 6, No. 1, p51~57*

Tatsuya Kanuma et al.

【目的】細胞周期の G1 制御にかかわる p 16-cyclinD/cdk 4-Rb 系の遺伝子変異と卵巣癌化の分子機構とのかかわりを明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】ヒト卵巣癌組織より樹立された 11 種類の細胞株を用い、RT-PCR により p 16 mRNA の発現の有無を検討した。PCR-SSCP 法により p 16 cDNA の突然変異の有無を検討した。バンドシフトの認められた cDNA はサブクロニングし、塩基配列を決定した。Southern blot 法により p 16 遺伝子のホモ接合性欠失の有無を観察した。Immunoblot 法により p 16, cyclinD, cdk 4 および Rb 蛋白の検出を行った。さらに p 16 以外の cdk インヒビターである p 15, p 21, p 27 についても欠失・変異の有無を検討した。

【結果】11 種類のヒト卵巣癌細胞株のうち、SKOV, RMG-1 および TYK-nu の 3 株で p 16 遺伝子のホモ接合性欠失が観察された。MCAS 株では SSCP において biallelic なバンドシフトが観察され、codon 11, codon 22, codon 27, codon 28 および codon 92 にミスセンス変異が観察された。KF 株では p 16 遺伝子の転写抑制が観察された。これら五つの細胞株では p 16 蛋白は検出されなかった。p 16 mRNA が発現し、変異もなかった残り 6 株のうち、HAC-2, Kuramochi, MH および

HTOA の 4 株では Rb 蛋白が検出されなかった。KF 株では免疫沈降法により cyclinD の過剰発現が観察された。p 15 は SKOV および TYK-nu の 2 株で欠失しており、これらには 9 p 21 領域の広範な欠失があることが推察された。p 21 および p 27 には欠失・変異は認められなかった。

【考察】癌抑制遺伝子と考えられている p 16 あるいは Rb の高頻度の機能喪失が卵巣癌株において観察され、また癌遺伝子と考えられている cyclinD の過剰発現が観察された 1 株と併せると、検討した例数は少ないが、卵巣癌の約 90% において G1 チェックポイントにおける一つの重要は制御系である p 16-cyclinD/cdk 4-Rb 系の一つの遺伝子に機能異常が存在するという結果が得られた。cdk 4 の点突然変異は悪性黒色腫と肺癌においてそれぞれ 1 例報告されているので、今回検討した細胞株のうち、p 16, cyclinD および Rb には異常の認められなかった PA-1 株における cdk 4 の変異についてはさらに検討する必要があるかもしれない。以上のことから、p 16-cyclinD/cdk 4-Rb 系の機能異常は、癌細胞における無軌道な細胞増殖という概念を支持するものであり、卵巣癌化においてはこの系の変異がきわめて重要な機構となっていることが示唆された。

(鹿沼達哉, 群馬大学医学部産科婦人科学教室)